

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**IMPACTO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CO<sub>2</sub>  
ATMOSFÉRICO SOBRE O PERÍODO LATENTE E O  
CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM DO CAFEEIRO**

**LÍVIA MENDES**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP  
Setembro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**IMPACTO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CO<sub>2</sub>  
ATMOSFÉRICO SOBRE O PERÍODO LATENTE E O  
CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM DO CAFEEIRO**

**LÍVIA MENDES**

Orientadora: Dra. Raquel Ghini

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP  
Setembro – 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

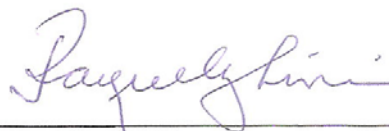
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: "IMPACTO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CO<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO  
SOBRE O PERÍODO LATENTE E O CONTROLE BIOLÓGICO DA FER-  
RUGEM DO CAFEIEIRO"**

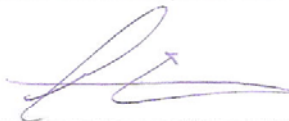
**ALUNA: LÍVIA MENDES**

**ORIENTADORA: PROFª DRª RAQUEL GHINI**

Aprovado pela Comissão Examinadora



\_\_\_\_\_  
**PROFª DRª RAQUEL GHINI**



\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO**



\_\_\_\_\_  
**PROFª DRª FLÁVIA RODRIGUES ALVES PATRÍCIO**

Data da Realização: 02 de setembro de 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M538i	<p>Mendes, Livia, 1984-</p> <p>Impacto do aumento da concentração de CO2 atmosférico sobre o período latente e o controle biológico da ferrugem do cafeeiro / Livia Mendes. - Botucatu : [s.n.], 2009. vii, 42 f. il., color., gráfs., tabs.</p> <p>Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2009</p> <p>Orientador: Raquel Ghini</p> <p>Inclui bibliografia</p> <p>1. Mudanças climáticas. 2. CO2. 3. <i>Hemileia vastatrix</i>. 4. Controle biológico. I. Ghini, Raquel. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"(Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.</p>
-------	---

Aos meus pais Luiz e Fátima, minha irmã Letícia  
pelo apoio, carinho e confiança.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelos dons da vida e da inteligência.

À Dra. Raquel Ghini pelos ensinamentos, paciência e apoio.

À UNESP/FCA, pela oportunidade da realização do curso.

À Embrapa Meio Ambiente pela infra-estrutura na condução dos experimentos.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Aos professores do Programa de Proteção de Plantas, pelo aprendizado nas disciplinas.

Ao pesquisador Dr. Wagner Bettiol pela ajuda e ensinamentos.

À pesquisadora Dra. Vanda Malavolta pelo incentivo, ensinamentos e amizade iniciados na graduação.

Aos colegas da Pós-Graduação e do Laboratório de Microbiologia Ambiental, em especial, Mônica, Guta, Fábio, Tatiana, Ana Laura, Marina, Liliana, Zayame, Regiane, Alexandre, Alê, Fernando, Élide, Flávia, Gabriela, Sarah, pelo convívio, amizade e apoio em todos os momentos.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental (João, Roseli, Márcia e Elke) e dos Campos Experimentais (Abrahão e Waldemore), pela colaboração na condução dos experimentos, idéias, apoio e amizade.

Aos amigos que sempre me apoiaram.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
1 RESUMO.....	01
2 SUMMARY.....	03
3 INTRODUÇÃO.....	05
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
4.1 Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas e controle biológico.....	07
4.2 Efeitos do CO <sub>2</sub> sobre doenças de plantas.....	09
4.3 Cultura do café.....	11
4.4 Ferrugem do cafeeiro.....	12
4.5 Controle biológico da ferrugem do cafeeiro.....	14
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1 Efeito da concentração de CO <sub>2</sub> sobre agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro avaliado em discos foliares.....	17
5.1.1 Obtenção da suspensão dos antagonistas.....	18
5.1.2 Obtenção da suspensão de uredíniosporos.....	18
5.1.3 Inoculação.....	19
5.1.4 Viabilidade da suspensão de <i>H. vastatrix</i> .....	20
5.1.5 Avaliações.....	20
5.2 Efeito da concentração de CO <sub>2</sub> sobre <i>Hemileia vastatrix</i> em plântulas de cafeeiro.....	21
5.3 Análise dos dados.....	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.1 Efeito da concentração de CO <sub>2</sub> sobre agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro avaliado em discos foliares.....	24
6.2 Efeito da concentração de CO <sub>2</sub> sobre <i>Hemileia vastatrix</i> em plântulas de cafeeiro.....	32

7 CONCLUSÕES.....	35
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Vista geral da sala climatizada. (A) Compressor de ar; (B) Cilindro para injeção de CO <sub>2</sub> puro; (C) Ar condicionado; (D) Aquecedor; (E) Lâmpadas; (F) IRGA.....	17
2 Aplicação dos antagonistas 24 horas antes, após e simultaneamente à inoculação de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	19
3 Plântulas de café acondicionadas em caixas plásticas para avaliar o efeito da concentração do CO <sub>2</sub> sobre a ferrugem do cafeeiro.....	22
4 Folha de cafeeiro inoculada com suspensão de uredíniosporos de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	22
5 Concentração média de CO <sub>2</sub> nos tratamentos dos experimentos A e B.....	25
6 Concentração média de CO <sub>2</sub> nos tratamentos do experimento C.....	25
7 Concentração média de CO <sub>2</sub> no experimento com plântulas de cafeeiro para avaliar seu efeito sobre a ferrugem.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Área abaixo da curva do progresso da esporulação (AACPE) e porcentagem de área foliar lesionada por <i>Hemileia vastatrix</i> em diferentes concentrações de dióxido de carbono e períodos de inoculação do antagonista <i>Bacillus subtilis</i> .....	27
2 Efeito da concentração de CO <sub>2</sub> na unidade formadora de colônias de <i>Bacillus</i> nos discos foliares de cafeeiro, 62 dias após a inoculação.....	28
3 Área abaixo da curva do progresso da esporulação (AACPE) e porcentagem de área foliar lesionada por <i>Hemileia vastatrix</i> em diferentes concentrações de dióxido de carbono e períodos de inoculação do antagonista <i>Bacillus pumilus</i> .....	29
4 Área abaixo da curva do progresso da esporulação (AACPE) e porcentagem de área foliar lesionada por <i>Hemileia vastatrix</i> em diferentes concentrações de dióxido de carbono e períodos de inoculação do antagonista <i>Lecanicillium longisporum</i> .....	31
5 Período latente médio (PLM) no segundo e terceiro pares de folhas em diferentes concentrações de dióxido de carbono.....	33
6 Esporulação de <i>Hemileia vastatrix</i> , área foliar (cm <sup>2</sup> ), área foliar lesionada (%) do segundo e terceiro pares de folhas das plântulas de café em diferentes concentrações de dióxido de carbono.....	34
7 Diâmetro do caule (mm) e altura (cm) das plântulas de café em diferentes concentrações de dióxido de carbono.....	34

## 1 RESUMO

O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico previsto para as próximas décadas poderá provocar alterações nas relações patógeno-hospedeiro e, conseqüentemente, no manejo das doenças de plantas. Devido às alterações dos processos fisiológicos e metabólicos da planta, distribuição temporal e espacial da doença, os agentes de biocontrole também estão sujeitos a essas alterações. Assim, é necessário conhecer os efeitos dessas mudanças nas doenças de plantas e sobre os agentes de biocontrole, para adoção de medidas de adaptação. O efeito do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> (380, 430, 700 e 1300 ppm de CO<sub>2</sub>) sobre controle biológico da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) com *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Lecanicillium longisporum* foi avaliado sobre a esporulação do patógeno e a severidade da doença em discos foliares (1,5 cm). Os antagonistas foram aplicados 24 horas antes, simultaneamente e 24 horas após a inoculação do patógeno em discos foliares mantidos em câmaras com fotoperíodo de 12 horas, a 22 °C e 100% de umidade relativa. Para avaliar o efeito do gás sobre o período latente da ferrugem, plântulas de cafeeiro foram mantidas nas concentrações de 400, 500, 700 e 900 ppm de CO<sub>2</sub> e inoculadas com uredíniosporos do patógeno. Além do período latente, foram avaliados o

diâmetro do caule, a área foliar e a altura das plântulas. Os antagonistas *B. subtilis*, *B. pumilus* e *L. longisporum* não foram afetados pelo aumento da concentração de CO<sub>2</sub>. *B. subtilis* foi efetivo no controle da ferrugem independentemente da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico, sendo mais efetivo quando aplicado antes e simultaneamente à inoculação do patógeno. *B. pumilus* independente do CO<sub>2</sub> e do momento de aplicação, não influenciou o crescimento da doença, representado pela área abaixo da curva do progresso de esporulação (AACPE) e pela porcentagem da área foliar lesionada. Em *L. longisporum* observou-se a redução da AACPE e da porcentagem da área foliar lesionada, independente da concentração de CO<sub>2</sub>. O período latente médio da ferrugem do cafeeiro foi de 36,4; 21,2; 21,3 e 18,6 dias para as concentrações de 400, 500, 700 e 900 ppm de CO<sub>2</sub> em condições de 100% de umidade relativa e temperatura a 22 °C.

---

Palavras-chave: mudanças climáticas, CO<sub>2</sub>, *Hemileia vastatrix*, controle biológico.

IMPACT OF RISING CO<sub>2</sub> ATMOSPHERIC CONCENTRATION ON THE LATENT PERIOD AND THE BIOLOGICAL CONTROL OF COFFEE LEAF RUST. Botucatu, 2009. 42p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista

Author: LÍVIA MENDES

Adviser: RAQUEL GHINI

## 2 SUMMARY

The rising concentration of atmospheric CO<sub>2</sub> for the coming decades may cause changes in pathogen-host relationships, and therefore the management of diseases of plants. Due to changes in physiological and metabolic processes of the plant, temporal and spatial distribution of the disease, the biocontrol agents are also subject to these amendments. Thus, it is necessary to know the effects of changes in diseases of plants and on the biocontrol agents, for adoption of adaptation measures. The effect of rising concentration of CO<sub>2</sub> (380, 430, 700 and 1300 ppm CO<sub>2</sub>) on biological control of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) with *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* and *Lecanicillium longisporum* was evaluated on the sporulation of the pathogen and the severity of disease in leaf discs (1.5 cm). The antagonists were applied 24 hours before, simultaneously and 24 hours after inoculation of the pathogen in leaf discs incubated in chambers with a photoperiod of 12 hours at 22 °C and 100% relative humidity. To evaluate the effect of gas on the latent period of rust, coffee seedlings were maintained at concentrations of 400, 500, 700 and 900 ppm CO<sub>2</sub> and inoculated with uredospores of the pathogen. Besides the latent period were measured the diameter of stem,

leaf area and seedling height. The antagonists *B. subtilis*, *B. pumilus* and *L. longisporum* were not affected by increasing the concentration of CO<sub>2</sub>. *B. subtilis* was effective in controlling rust regardless of the concentration of atmospheric CO<sub>2</sub>, which is more effective when released before, while the inoculation of the pathogen. *B. pumilus* independent of CO<sub>2</sub> and the time of application did not influence the growth of the disease, represented by the area under the curve of progress of sporulation (AUCPS) and the percentage of leaf area injured. In *L. longisporum* observed the reduction of AUCPS and the percentage of leaf area injured, regardless of the concentration of CO<sub>2</sub>. The average latent period of rust coffee was 36.4, 21.2, 21.3 and 18.6 days for concentrations of 400, 500, 700 and 900 ppm of CO<sub>2</sub> under 100% relative humidity and temperature at 22 °C.

---

Keywords: climate change, CO<sub>2</sub>, *Hemileia vastatrix*, biological control.

### **3 INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, a intensificação das atividades antrópicas tem resultado em maior emissão de gases do efeito estufa. O aumento das concentrações dos gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), causa a elevação da temperatura na superfície do planeta e, consequentemente, o aumento do nível do mar e alterações na intensidade e distribuição de chuvas e ventos, além de outras alterações. Essas mudanças interferem diretamente na agricultura, modificando o zoneamento agrícola, a produtividade e técnicas de manejo em diversas culturas. Com isso, a economia e a sociedade podem sofrer graves consequências.

Dentre os gases do efeito estufa, o  $\text{CO}_2$  é o gás mais emitido pela ação do homem. Desde a Revolução Industrial, a concentração de  $\text{CO}_2$  na atmosfera aumentou cerca de 30%, oriunda principalmente da queima de combustíveis fósseis e mudança no uso da terra. Segundo o IPCC (2007), a concentração desse gás tende a aumentar em até 1000 ppm no cenário futuro, caso não ocorra uma mudança de comportamento e a redução da emissão destes gases para a atmosfera.

Estudos demonstram que a elevação da concentração do CO<sub>2</sub> provoca efeitos benéficos no desenvolvimento das plantas, por promover alterações no metabolismo, crescimento e processos fisiológicos. Essa mudança pode ocasionar um efeito positivo, negativo ou neutro na ocorrência e severidade de doenças de plantas. O manejo das doenças também pode ser alterado devido às modificações na microbiota, distribuição geográfica e interação com outros microrganismos que interagem com as plantas, como os agentes de controle biológico. Existem poucos relatos sobre os efeitos do CO<sub>2</sub> sobre as doenças de plantas e os agentes de controle biológico. Assim, faz-se necessária a realização de estudos relacionados ao assunto.

O café é considerado um dos principais produtos agrícolas do Brasil, o qual é o maior produtor e exportador. O cafeeiro está sujeito à incidência de várias doenças, entre elas, a ferrugem causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, que é a principal doença desta cultura. O uso de agentes de controle biológico é uma alternativa promissora para o controle da ferrugem, visto que embora o controle químico seja eficiente mostra-se agressivo ao ambiente.

No Brasil, há relatos sobre os impactos das mudanças climáticas no cafeeiro, referentes ao zoneamento agroclimático (ASSAD et al., 2004) e às doenças e pragas (POZZA; ALVES, 2008; GHINI et al., 2008c). Assim, o presente trabalho tem por objetivo verificar os efeitos do aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico sobre a eficácia de antagonistas no controle da ferrugem do cafeeiro e sobre o período latente da doença.



## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas e controle biológico**

Com o advento da Revolução Industrial e a intensificação das atividades antrópicas, a concentração de dióxido de carbono vem aumentando de maneira drástica, e desta forma interferindo no ambiente. Amostras retiradas das geleiras da Antártica revelam que as concentrações atuais de carbono são as mais altas dos últimos 420.000 anos. Desde 1750, o CO<sub>2</sub> aumentou 30%, e mais da metade desse crescimento ocorreu nos últimos cinquenta anos (MARENGO, 2006; IPCC, 2007).

Além do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> devido principalmente à queima de combustíveis fósseis e à mudança no uso da terra, outros gases de efeito estufa promovem a ocorrência das mudanças climáticas. São eles: metano (CH<sub>4</sub>), ozônio (O<sub>3</sub>), monóxido de carbono (CO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), derivados principalmente da agricultura (IPCC, 2007). Segundo Marengo (2006), os modelos globais do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) mostram que há um aumento na temperatura global, devido à grande liberação dos gases do efeito estufa, o que evidencia as mudanças climáticas como:

seca, enchentes, furacões, causando impactos no ambiente. Nos últimos onze anos (1995 a 2006), as temperaturas médias do planeta foram as mais altas desde 1850 (IPCC, 2007).

O Brasil é considerado o quarto maior emissor de gases do efeito estufa do planeta, devido às intensas queimadas por desmatamento e o uso de combustíveis fósseis. O país é vulnerável a mudança climática e necessita que as medidas de mitigação e adaptação sejam integradas nas políticas ambientais para que se minimizem os efeitos já observados, como as chuvas intensas (MARENGO, 2006; MARENGO et al., 2007). O desenvolvimento sustentável, aliado aos estudos sobre a vulnerabilidade das regiões e setores produtivos, pode reduzir a vulnerabilidade à mudança do clima, aumentando a capacidade de adaptação e a resiliência do sistema (IPCC, 2007).

A vulnerabilidade de uma região à mudança climática pode ser avaliada através de modelos climáticos globais que se baseiam nas propriedades físicas, químicas e biológicas de seus componentes. Devido à variabilidade de cada região, esses modelos apresentam várias limitações, pois as mudanças previstas devem ser tanto sazonais quanto espaciais (GHINI; HAMADA, 2008). No Brasil, as estimativas dos modelos climáticos globais observados são de aumento na temperatura não uniforme e diminuição da precipitação que varia em regiões e meses do ano (HAMADA et al., 2008).

As mudanças climáticas podem ou não ter efeito sobre problemas fitossanitários. Assim, os impactos na sociedade, economia e ambiente podem ser positivos, negativos ou neutros (GHINI, 2005). Garret et al. (2006) afirmam que com as mudanças climáticas, a pressão de seleção nas populações de hospedeiros podem resultar na diversidade de resistência genética. Os fitopatógenos podem ser potencialmente incapazes de migração ou rápida adaptação às mudanças nas condições climáticas, mas a maioria terá vantagem sobre as plantas por terem um tempo de geração mais curto e, em muitos casos, a habilidade de se dispersarem rapidamente pelo vento (JEGER; PAUTASSO, 2008).

Entre as culturas de interesse agrônomo no Brasil, o cafeeiro se destaca por sua importância econômica e social. Assad et al. (2004) relataram os impactos das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático dessa cultura. As atuais regiões produtoras de café serão reduzidas drasticamente, caso não se altere as condições genéticas e fisiológicas das atuais variedades. Pozza e Alves (2008) estudaram os impactos das mudanças climáticas em relação à intensidade de doenças fúngicas do cafeeiro. O comportamento das doenças será

modificado devido ao aumento de temperatura e a concentração de chuvas em alguns meses do ano. Com o deslocamento do cultivo de café para áreas mais adequadas, podem surgir novas doenças e a seleção de patógenos mais adaptados, que geram maiores custos de produção da cultura. Ghini et al. (2008c) observaram que haverá maior infestação por espécies de *Meloidogyne incognita* e *Leucoptera coffeella* no cafeeiro, quando comparados no clima futuro.

Atualmente, os impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas baseiam-se em observações indiretas (BETTIOL, 2008). Na literatura praticamente não existem estudos sobre esse assunto (GHINI, 2005). Manning e Tiedemann (1995) sugerem que o aumento das concentrações dos gases CO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> e da radiação ultravioleta modifica as comunidades da microbiota da rizosfera e filosfera. As mudanças na diversidade das plantas e consequentemente na comunidade microbiana podem alterar a ocorrência de doenças por meio do controle biológico natural (COAKLEY et al., 1999, GRÜTER et al., 2006). As variações de temperatura e precipitação exigem a seleção de antagonistas que atuem efetivamente no cenário futuro em diferentes regiões. Ghini et al. (2008b) afirmam que o controle biológico natural e introduzido serão beneficiados com as mudanças climáticas, visto que a tendência à redução da emissão de gases poluentes que minimizam os problemas ambientais, levam a um determinado equilíbrio biológico, o qual facilita a introdução de um agente de biocontrole.

#### **4.2 Efeitos do CO<sub>2</sub> sobre doenças de plantas**

Os efeitos das mudanças climáticas podem atuar tanto no hospedeiro quanto no patógeno e também na interação de ambos, de maneira direta ou indireta (AGRIOS, 2004). A alteração da distribuição geográfica pelas variações de temperatura e precipitação, os danos causados pelas doenças (com perdas de produtividade) e a eficácia dos métodos de controle influenciam na ocorrência de doenças devido ao aumento da concentração de CO<sub>2</sub> (GHINI, 2005). A severidade da doença pode ser determinada pela alteração da resistência do hospedeiro, que retarda a penetração do patógeno, e pela maior disponibilidade de sítios de infecção, que permite um microclima favorável para seu desenvolvimento. A longo prazo, com o aumento da esporulação e agressividade do patógeno e a alteração da resistência do

hospedeiro demonstram as adaptações decorrentes das relações patógeno-hospedeiro (CHAKRABORTY et al., 2008).

As mudanças decorrentes do incremento de CO<sub>2</sub> causam modificações no metabolismo, crescimento e processos fisiológicos das plantas. Essas alterações provocam efeitos benéficos como aumento da biomassa e densidade da copa, que resulta em maior área para desenvolvimento do patógeno e limitação na disponibilidade de nutriente e água. A modificação na estrutura da parte aérea da planta influencia os componentes epidemiológicos das doenças por alteração do microclima (GHINI, 2005).

Chakraborty et al. (2000a) evidenciam que as mudanças provocadas em *Stylosanthes scabra* pelo aumento da concentração de CO<sub>2</sub> como a redução da densidade de estômatos, o aumento do teor de carboidratos nas folhas e maior camadas de ceras e células epidérmicas influenciam nas relações patógeno-hospedeiro. O aumento do teor de carboidratos estimula patógenos dependentes de açúcares, como as ferrugens. Porém, a redução de abertura dos estômatos inibe a penetração dos mesmos (MANNING; TIEDEMANN, 1995). As alterações na fisiologia das plantas podem influenciar os mecanismos de resistência das relações patógeno-hospedeiro devido ao aumento da concentração de CO<sub>2</sub> (GHINI et al., 2008a). Estudos realizados com os fitopatógenos *Erysiphe graminis* e *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos à concentração de 700 ppm reduzem a severidade da doença em relação à concentração de 350 ppm possivelmente pelo atraso no desenvolvimento inicial do patógeno e sua redução na penetração no hospedeiro (HIBBERD et al., 1996; CHAKRABORTY et al., 2000b).

Goldson (2006) afirma que possivelmente as mudanças climáticas terão um impacto potencial no estabelecimento do controle biológico em diferentes zonas climáticas. Os microrganismos presentes na filosfera sofrerão modificações, mas ainda não estão completamente esclarecidos, pois as mudanças que ocorrerão na fisiologia da planta podem alterar os mecanismos de resistência, como também seu equilíbrio (GHINI, 2005). Coakley et al. (1999) concluíram que os efeitos das mudanças climáticas no manejo de doenças de plantas podem ser menos importantes do que mudanças nos padrões de uso da terra, melhoramento de plantas e disponibilidade de produtos para controle químico. Os efeitos das mudanças climáticas tendem a ser diferentes para cada patossistema em diferentes localidades.

Os métodos de experimentação para avaliar o efeito do aumento da concentração do CO<sub>2</sub> e também de outros gases podem ser realizados em ambientes controlados. Apesar de apresentarem limitações, por permitirem apenas uma variável estudada, os experimentos em câmaras controladas solucionam hipóteses sobre quais os efeitos que esse gás pode causar em doenças de plantas, nas relações patógeno-hospedeiro e nos métodos de controle. As estufas de topo aberto (open-top chambers – OTC) são uma alternativa para criar um ambiente mais realista. Porém, o microclima em seu interior é alterado pela estrutura de plástico que envolve as estufas. Experimentos conduzidos em campo do tipo FACE (Free Air Carbon Dioxide Enrichment) permitem uma resposta sem alteração do microclima, com extensa área de amostragem (GHINI, 2005).

#### **4.3 Cultura do café**

O Brasil produz cerca de 33,7 milhões de sacas de café beneficiado e é considerado o maior produtor e exportador de café. Minas Gerais vem se destacando como o Estado maior produtor de café do país. No sul de Minas está concentrada cerca da metade da produção do Estado (CHACUR et al., 2007). Trata-se de uma planta perene de clima tropical, pertencente à família das Rubiaceas e ao gênero *Coffea* que reúne mais de 100 espécies descritas e duas espécies de importância econômica: *C. arabica* e *C. canephora* (ZAMBOLIM et al., 2005).

O cafeeiro, para se desenvolver normalmente, necessita de umidade disponível no solo durante o período de setembro/outubro a abril/ maio, épocas coincidentes da floração até o enchimento dos grãos. As condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento variam entre as espécies. A temperatura quando está abaixo de 16°C e acima de 24°C, no caso de café arábica, são inadequadas para o cultivo (BOLDINI, 2001).

Os principais fatores climáticos envolvidos no processo de ocorrência e desenvolvimento das doenças são temperatura, umidade, vento, luz e radiação solar. Esses fatores podem influenciar em menor ou maior intensidade, na severidade das doenças que, de alguma forma, podem ser manejadas, obtendo-se assim, um aumento na resistência dos cafeeiros às doenças ou uma promoção das condições menos favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos (VALE et al., 2000; CARVALHO et al., 2002). Lin (2007) verificou que a

presença de árvores para sombreamento do cafeeiro pode ser aplicada em regiões as quais as mudanças climáticas são acentuadas, como a temperatura elevada, o que minimiza os danos à cultura pelo estresse hídrico.

Há uma série de doenças prejudiciais à cultura cafeeira, causadas por bactérias, vírus, nematóides e principalmente por fungos, entre eles destacam-se *Hemileia vastatrix*, *Cercospora coffeicola*, *Phoma costaricensis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Ascochyta coffeae* e *Rosellinia* spp.. Esses patógenos são capazes de causar desde a redução no desenvolvimento das plantas como raquitismo, seca dos ponteiros, queda elevada de folhas, murcha, redução na produção, até a morte – dependendo do agente etiológico, das condições climáticas e da suscetibilidade do hospedeiro (ZAMBOLIM et al., 2005). Dentre as doenças que ocorrem na cultura do café, a ferrugem é considerada de maior importância, por causar grandes prejuízos em todas as regiões produtoras.

#### **4.4 Ferrugem do cafeeiro**

A ferrugem do cafeeiro é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br (Ordem: Uredinales; Família: Pucciniaceae). Foi constatada pela primeira vez em 1868 por Berkeley no Sri Lanka. No Brasil, em 1970, no Sul da Bahia, Medeiros relatou seu primeiro foco. O fungo é considerado um biotrófico específico do cafeeiro. As características que distinguem essa espécie são: seu hábito de esporulação e penetração pelos estômatos (ZAMBOLIM et al., 2005).

Os principais prejuízos ocasionados pela doença são: redução na área foliar, pela formação de lesões e queda precoce das folhas e a seca dos ramos laterais, provocando gradualmente a deformação das plantas. A desfolha provoca uma redução no florescimento e na frutificação, afetando a produtividade (CARVALHO et al., 2002; GUZZO, 2004).

Os sintomas da ferrugem manifestam-se nas folhas, aproximadamente entre o 7º e 15º dia após a penetração do patógeno, dependendo da suscetibilidade da planta e temperatura para seu desenvolvimento (BOLDINI, 2001). Na face inferior de limbo foliar, formam-se pequenas manchas cloróticas translúcidas, que evoluem para massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjado. Na face superior do limbo são observadas manchas

cloróticas amareladas, no limite da pústula inferior, que necrosam as folhas posteriormente (AGRIOS, 2004).

A presença das pústulas nas folhas reduz a área fotossintética da planta, além de uma abscisão prematura dessas folhas, algumas vezes precedida por uma clorose generalizada. A doença pode, ocasionalmente, atacar as extremidades de ramos das brotações novas e os frutos verdes. Quando ocorre a desfolha antes do florescimento, há interferência na formação dos botões florais e frutificação. Se ocorrer durante o desenvolvimento dos frutos acontecerá a má formação dos grãos, comprometendo a produção da safra seguinte (BOLDINI, 2001, ZAMBOLIM et al., 2005).

O ciclo de vida da ferrugem é incompleto, pois ocasionalmente os teliósporos são formados e produzem basidiósporos cujo hospedeiro intermediário é desconhecido até o momento. Os esporos assexuais (uredíniosporos) são reniformes equinulados dorsalmente, lisos ventralmente e infectam continuamente e sucessivamente as folhas do cafeeiro (AGRIOS, 2004; ZAMBOLIM et al., 2005).

A germinação e penetração dos uredíniosporos ocorrem pelos estômatos da folha, em condições de temperatura variáveis entre 21 a 23 °C (sendo ótima a 22 °C), alta umidade relativa e sob baixa luminosidade. O alongamento do tubo germinativo só ocorre a 30 °C. O período de incubação varia de 29 a 62 dias e o período latente de 38 a 70 dias (ZAMBOLIM, et al., 2005).

Os fungos *Verticillium hemileiae*, *Cladosporium hemileiae* e *Glomerella cingulata* parasitam as pústulas de ferrugem nas regiões onde o clima é favorável ao seu desenvolvimento: alta umidade relativa e cafezais sombreados (CARVALHO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2005).

Para ocorrência de uma doença são necessários diversos fatores, bióticos e abióticos, atuando em conjunto. Esses fatores são: da planta hospedeira, do patógeno e do ambiente (AGRIOS, 2004). Os fatores ambientais relacionados com o hospedeiro e patógeno influenciam no sistema epidemiológico. E são importantes que sejam conhecidos os índices de incidência e a evolução da doença para que possam ser aplicadas medidas de controle (GARÇON, et al., 2004).

O controle da ferrugem do cafeeiro envolve o uso de fungicidas sistêmicos e protetores, além de variedades resistentes. O uso de fungicidas, embora eficientes,

atuam de modo agressivo ao ambiente. Os sistemas de previsão de doenças são utilizados para aperfeiçoar e racionalizar a aplicação desses produtos. E ainda, auxiliam na tomada de decisão, por indicarem os períodos favoráveis de ocorrência das doenças e, consequentemente, os momentos mais apropriados à realização das pulverizações (OLIVEIRA, 2005; ZAMBOLIM et al. 2005).

O uso de variedades resistentes, como Icatú, Oeiras MG 6851, Obatã, Tupi, Iapar 59, Catucaí, Katipó, é uma alternativa viável de controle, pois apresentam resistência vertical e horizontal à ferrugem do cafeeiro (CARVALHO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2005). Ressalta-se que algumas variedades estão perdendo gradualmente sua resistência à *H. vastatrix* devido ao aumento de sua virulência (SILVA et al., 2006b).

#### **4.5 Controle biológico da ferrugem do cafeeiro**

O controle biológico tem-se apresentado promissor ao controle da ferrugem do cafeeiro através da introdução de organismos que combatem o patógeno (MARTINS, 1991; BETTIOL et al. 1994). As interações entre o agente de biocontrole e o patógeno podem ocorrer por antibiose, parasitismo, competição, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro. O antagonista pode apresentar mais de um mecanismo de ação sobre o patógeno (BETTIOL, 1991).

As bactérias são os microrganismos mais frequentes encontrados em associação com as plantas (SILVA et al., 2006a). As bactérias endofíticas são utilizadas para proteger o hospedeiro ao ataque do patógeno obtendo-se grande eficiência, podendo causar efeitos benéficos em seu hospedeiro, como a indução de resistência e também a promoção de crescimento (ROMEIRO, 2007). A aplicação desses microrganismos isolados de locais onde é previsto o seu uso confere vantagens no estabelecimento dos mesmos, influenciando no desenvolvimento do patógeno (BLAKEMAN, FOKKEMA, 1982).

A eficiência do agente de biocontrole para o controle da ferrugem do cafeeiro depende do momento de sua aplicação. Por exemplo, bactérias endofíticas quando aplicadas antes do aparecimento dos sintomas apresentam maior potencial de ação do que quando a doença já se estabeleceu. Sugere-se que as ações dos antagonistas ocorrem por antibiose e/ou lise das estruturas do patógeno e/ou competição e/ou indução de resistência.



Mais estudos são necessários para determinar o modo de ação dessas bactérias, como a densidade populacional para aplicação e a melhor forma de introdução no hospedeiro. Devem-se considerar os impactos que possam causar, visto que algumas bactérias aumentam a severidade da doença (SHIOMI et al. 2006, SILVA et al., 2008a).

O gênero *Bacillus* é amplamente estudado como agente de biocontrole por obter ampla faixa de desenvolvimento em diferentes temperaturas. Com o aquecimento global oriundo das mudanças climáticas esse gênero possivelmente não alterará em seu modo de ação (BETTIOL, 2008). O *B. subtilis* atua como indutor de resistência sobre o hospedeiro, induzindo-o a expressar mecanismos de resistência e também por possuir compostos antifúngicos que inibem a germinação de uredíniosporos (MARTINS, 1991; BETTIOL, et al. 1994).

A indução de resistência é uma alternativa muito utilizada para proteção contra fungos fitopatogênicos. O uso de raças não patogênicas, organismos saprófitos, metabólitos e substâncias produzidas por outros microrganismos, como os endofíticos são utilizados para induzir resistência. Costa et al. (2007) utilizaram suspensões de propágulos de *B. subtilis* e *Pseudomonas putida* que reduziram a severidade da doença, por provável processo de indução de resistência. Guzzo e Martins (1996) observaram que as folhas tratadas previamente com *B. thuringiensis* apresentaram indução de resistência local e sistêmica pelo aumento de atividades de enzimas como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanases.

O parasitismo é um mecanismo de ação realizado por *Lecanicillium lecanii*, que é encontrado na natureza parasitando as pústulas de ferrugem (BETTIOL, 1991). Eskes et al. (1991) relataram que a presença de uredíniosporos reforça a germinação de esporos do antagonista, que podem atuar por parasitismo ou antibiose. O gênero *Lecanicillium* apresenta baixo nível de especificação de hospedeiro (GOETTEL et al., 2008).

Hadadd et al. (2009) testaram isolados de *Bacillus* sp. (obtido de plantações de café orgânico) e *Pseudomonas* sp. em condições de campo. Os resultados obtidos apresentaram redução na incidência da doença, pela baixa taxa da germinação dos uredíniosporos. O isolado de *Bacillus* sp. obteve resultado semelhante ao fungicida à base de hidróxido de cobre. Futuramente, esses isolados podem ser utilizados para elaboração de formulações comerciais, visto que esses agentes de biocontrole apresentaram melhor atividade em experimentos de campo.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos em sala climatizada localizada na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, Estado de São Paulo, nos períodos de maio de 2008 a abril de 2009. Nessa sala climatizada a temperatura média é 22 °C e fotoperíodo de 12 horas (duas lâmpadas fluorescentes/bloco, 600-1000 lux) (Figura 1). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro concentrações CO<sub>2</sub> e cinco repetições. Cada repetição foi constituída por uma caixa plástica coberta por uma lâmina de vidro, na qual foram mantidos discos foliares ou plântulas de cafeeiro em tubetes.

O CO<sub>2</sub> puro foi injetado nas caixas oriundo de um cilindro de 25 quilos do gás liquefeito. Na saída do cilindro foi acoplado um manômetro para controle de volume e pressão de saída do gás. Do cilindro, o gás passou por uma válvula solenóide (registro eletromagnético), para um fluxômetro, o qual regulou sua vazão, e em seguida, para um divisor de até 24 saídas, dos quais saíram tubos de igual comprimento para as caixas. Em cada caixa, a injeção do CO<sub>2</sub> foi por um ou mais tubos através de orifícios na sua parte lateral, de acordo com cada tratamento. Para homogeneizar a distribuição do gás dentro das caixas foi injetado ar atmosférico externo à sala, com o auxílio de um compressor programado para ficar

ligado durante 15 minutos, e desligado por outros 15 minutos. Uma caixa (testemunha absoluta) sem injeção de CO<sub>2</sub> e ar externo foi mantida em cada bloco. As concentrações das caixas foram monitoradas com um analisador portátil de gás infravermelho (IRGA – modelo 8732/IAQ-CALC<sup>®</sup>).



**Figura 1.** Vista geral da sala climatizada. (A) Compressor de ar; (B) Cilindro para injeção de CO<sub>2</sub> puro; (C) Ar condicionado; (D) Aquecedor; (E) Lâmpadas; (F) IRGA.

### **5.1 Efeito da concentração de CO<sub>2</sub> sobre agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro avaliado em discos foliares**

Os experimentos em que se testou a eficácia do controle biológico sobre a ferrugem do cafeeiro em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> foram baseados na metodologia de discos foliares, descrita por Eskes (1982). Folhas jovens de café da cv. Mundo Novo foram obtidas na Fazenda Pelton, de cultivo de café orgânico, localizada em Pedreira/SP. Os discos foliares obtidos com auxílio de um furador de rolhas de 1,5 cm de diâmetro foram acondicionados, com a superfície abaxial para cima, sobre espuma umedecida contidas nas caixas plásticas (25 x 39 x 7,2 cm) vedadas com uma lâmina de vidro, de forma a

manter 100% da umidade relativa no seu interior. Os experimentos foram conduzidos em um esquema fatorial composto por quatro concentrações de CO<sub>2</sub> e três períodos de inoculação (antes, simultâneo e após a inoculação do patógeno), além das testemunhas de *H. vastatrix* e do antagonista e cinco repetições.

Para o experimento A, o antagonista utilizado foi o *Bacillus subtilis*, no experimento B foi o *Bacillus pumilus* e no experimento C, o *Lecanicillium longisporum*. Nos experimentos A e B a programação para injeção de CO<sub>2</sub> foi de 1 segundo de abertura da válvula solenóide a cada hora, obtendo-se as concentrações: 430, 700, 1300 ppm de CO<sub>2</sub>. Já no experimento C, a programação foi de 0,5 segundo de abertura da válvula solenóide a cada 80 minutos, obtendo-se as concentrações 430, 670 e 1200 ppm de CO<sub>2</sub>. Na testemunha absoluta a concentração média foi de 380 ppm de CO<sub>2</sub> em todos os experimentos .

#### 5.1.1 Obtenção da suspensão dos antagonistas

Os isolados de *B. subtilis* (AP-3, descrito por Bettiol e Kimati, 1989) e *B. pumilus* (SF 95, obtido pelo Laboratório da Sementes Farroupilha, Patos de Minas/MG) foram doados pelo Dr. Wagner Bettiol, do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente. Esses isolados foram cultivados em meio BDA (batata, dextrose e ágar), por 40 horas a 25 °C. Após esse período, obteve-se uma suspensão dos propágulos em água destilada acrescida de Tween 20 (1 gota em 250 mL água destilada) e padronizada em espectrofotômetro à OD<sub>550</sub>=0,6, equivalente a 10<sup>7</sup> ufc mL<sup>-1</sup> para o experimento com *B. subtilis* e OD<sub>550</sub>=0,8, equivalente a 10<sup>9</sup> ufc mL<sup>-1</sup> para o experimento com *B. pumilus*.

Para o antagonista *L. longisporum* foi utilizada uma suspensão de esporos do produto comercial Vertirril® WP (Itaforce Ltda) em água destilada acrescida de óleo vegetal emulsionável (0,25% do volume total da suspensão) e calibrada em câmara de Neubauer à concentração de 10<sup>7</sup> esporos/mL.

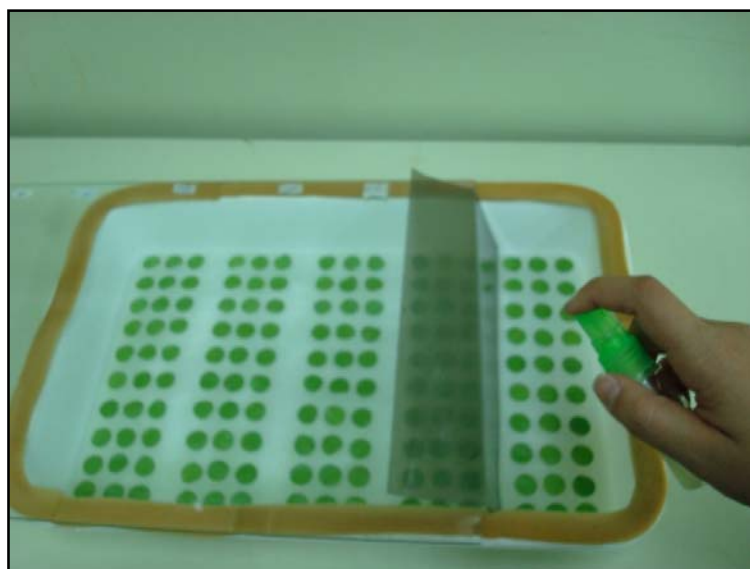
#### 5.1.2 Obtenção da suspensão de uredíniosporos

Uredíniosporos de *H. vastatrix* foram coletados com auxílio de cápsulas, a partir de folhas lesionadas de plantas de café da Embrapa Meio Ambiente. As

cápsulas foram mantidas dentro de um recipiente com dessecante sob refrigeração à 4°C, até sua utilização. A suspensão de uredíniosporos foi preparada em água destilada acrescida de Tween 20 (1 gota em 500 mL água destilada) e calibrada em câmara de Neubauer na concentração de  $10^5$  uredíniosporos/mL. A suspensão foi mantida sob constante agitação para homogeneização por um agitador magnético.

### 5.1.3 Inoculação

As inoculações foram realizadas por meio da pulverização manual a aproximadamente 10 cm de distância da superfície dos discos foliares. Cada caixa continha cinco parcelas, com 30 discos foliares cada, referentes aos períodos de aplicação do antagonista e de inoculação do patógeno. Em cada tratamento foram pulverizados 3 mL da suspensão de propágulos do antagonista 24 horas antes e após e simultaneamente à inoculação de 10 mL da suspensão de uredíniosporos por caixa (Figura 2). Após a inoculação da suspensão dos uredíniosporos, as caixas foram mantidas no escuro por 24 horas.



**Figura 2.** Aplicação dos antagonistas 24 horas antes, após e simultaneamente à inoculação de *Hemileia vastatrix*.

#### 5.1.4 Viabilidade da suspensão de *H. vastatrix*

A viabilidade do inóculo foi avaliada pela germinação de uredíniosporos em água sob as mesmas condições dos experimentos. Três lâminas foram acondicionadas em caixas do tipo gerbox com alta umidade relativa. Em cada lâmina foram colocadas duas gotas da suspensão de uredíniosporos e após 24 horas no escuro, a germinação foi avaliada em microscópio óptico (aumento 250x), determinando-se o percentual de uredíniosporos germinados em 12 campos. Considerou-se como uredíniosporo germinado aquele que, independente do seu comprimento, apresentou tubo germinativo. A porcentagem média de germinação dos uredíniosporos da suspensão inoculada foi 50,8% no experimento A, 76,6% no experimento B e 61,8% no experimento C.

#### 5.1.5 Avaliações

A severidade da doença foi avaliada por meio da esporulação de *H. vastatrix* e porcentagem de área lesionada nos discos foliares. Para a avaliação de esporulação foram realizadas três coletas, a partir do aparecimento dos sinais do patógeno, em intervalos semanais. Três discos de cada parcela foram colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de água destilada acrescida de Tween 20 (1 gota em 250 mL água destilada). Esses tubos foram mantidos em ultrassom por 15 minutos e armazenados em geladeira para posterior leitura em câmara de Neubauer.

Após 40 dias da inoculação da suspensão de uredíniosporos, as parcelas foram fotografadas e cinco discos foliares escolhidos aleatoriamente para a análise da área lesionada, com o auxílio do software “Library for Visual Image Analysis” – LIVIA (MIRANDA; NETO, 2008). A porcentagem de área lesionada do experimento A foi realizada por meio da mensuração visual (%) da área foliar infectada pela ferrugem.

No experimento A foi quantificado o número de unidades formadoras de colônias de *Bacillus* presente nos discos foliares após 62 dias da inoculação da suspensão de uredíniosporos. Esse teste consistiu na suspensão de 3 discos foliares em 10 mL de água destilada esterilizada, submetida à agitação por 10 minutos no ultrassom e posterior banho-maria a 80°C por vinte minutos. Foram retiradas alíquotas para obter diluição em série e

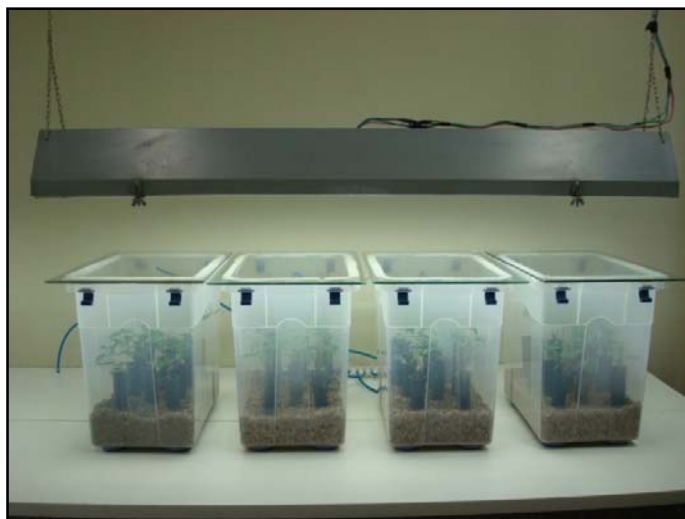
plaqueamento da diluição  $10^{-2}$  para posterior avaliação (BETTIOL, 1995 - modificado). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. No experimento C não foi possível quantificar o número de esporos do antagonista em câmara de Neubauer, devido ao seu crescimento micelial nos períodos inoculados.

## **5.2 Efeito da concentração de CO<sub>2</sub> sobre *Hemileia vastatrix* em plântulas de cafeeiro**

As plântulas de café da cv. Mundo Novo/ IAC 376-4, germinados em área, foram obtidas do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café "Alcides Carvalho" do Instituto Agrônomo de Campinas. Plântulas no estágio de orelha de onça foram transplantadas para tubetes (14 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro) contendo substrato à base de casca de *Pinus* (Multiplant<sup>®</sup>), sem adubação nitrogenada e mantidas em casa-de-vegetação por dez dias para pegamento e homogeneização. Após esse período, os tubetes foram transferidos para a sala climatizada, acondicionados sobre uma camada de vermiculita umedecida em caixas plásticas (20 x 31,5 x 32 cm) (cinco tubetes/caixa; 1 muda/tubete). As caixas foram vedadas com lâmina de vidro para manter alta umidade relativa (Figura 3). A programação de injeção de CO<sub>2</sub> foi de 1 segundo de abertura da válvula solenóide a cada 30 minutos, obtendo-se as concentrações de 500, 700, 900 ppm de CO<sub>2</sub>. Na testemunha absoluta a concentração foi de 400 ppm de CO<sub>2</sub>. Durante a execução desse experimento, as plântulas foram adubadas semanalmente com 3 mL em cada tubete de solução nutritiva composta de macro e micro nutrientes (produzida pela Qualifertil – Comércio e Representações – Ltda). As plântulas foram mantidas nessas condições por 35 dias para que as folhas a serem inoculadas com o patógeno fossem desenvolvidas nas respectivas concentrações do gás.

Transcorrido esse período, as folhas desenvolvidas nas respectivas concentrações de CO<sub>2</sub> foram inoculadas com uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* na concentração de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> (descrito no item 5.1.2). O segundo e o terceiro pares de folhas foram pulverizados manualmente, na parte abaxial, com 1 mL da suspensão de uredíniosporos por tubete (Figura 4). Após a inoculação as plântulas foram mantidas no escuro por 24 horas. No teste de viabilidade da suspensão de uredíniosporos (descrito no item 5.1.4) a porcentagem média de germinação foi 62,3%. Em relação aos pares foliares, o terceiro se

desenvolveu completamente nas condições das diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>, enquanto o segundo foi formado em condições ambientes.



**Figura 3.** Plântulas de café acondicionadas em caixas plásticas para avaliar o efeito da concentração do CO<sub>2</sub> sobre a ferrugem do cafeeiro.



**Figura 4.** Folha de cafeeiro inoculada com suspensão de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*.

As avaliações iniciaram-se 15 dias após a inoculação do patógeno com a contagem do número de pústulas por folha para determinação do período latente. Foram selecionadas duas folhas (uma do segundo e outra do terceiro pares de folhas) para as análises



de esporulação do patógeno, área foliar e porcentagem de área lesionada. Também foram avaliadas a altura das plântulas e o diâmetro do caule. O período latente médio (PLM) calculado com base na frequência de ocorrência de 50% do grau de reação correspondente às pústulas esporuladas foi obtido do segundo e terceiro pares de folhas

Aos 34 dias após a inoculação, as folhas selecionadas foram raspadas na superfície abaxial, com o auxílio de um estilete, para coleta dos uredíniosporos. Estes por sua vez, foram acondicionados em tubos de ensaio contendo 2 mL de água destilada acrescida de Tween 20 (1 gota em 250 mL água destilada). Essas suspensões foram tratadas com ultrassom por cinco minutos para homogeneização e posterior leitura em câmara de Neubauer. Após a coleta de uredíniosporos, as folhas foram medidas, com o auxílio de um medidor de área foliar. Para análise da área lesionada utilizou-se o mesmo software descrito no item 5.1.5.

A altura das plântulas foi determinada pela medida desde a superfície do substrato até o ápice da planta. Foram realizadas duas avaliações sendo a primeira no dia da inoculação e a segunda, após o quarto par de folhas formado, totalizando 85 dias de tratamento com atmosfera modificada. Em conjunto com a segunda avaliação da altura das plântulas, com auxílio de um paquímetro, foi mensurado o diâmetro do caule.

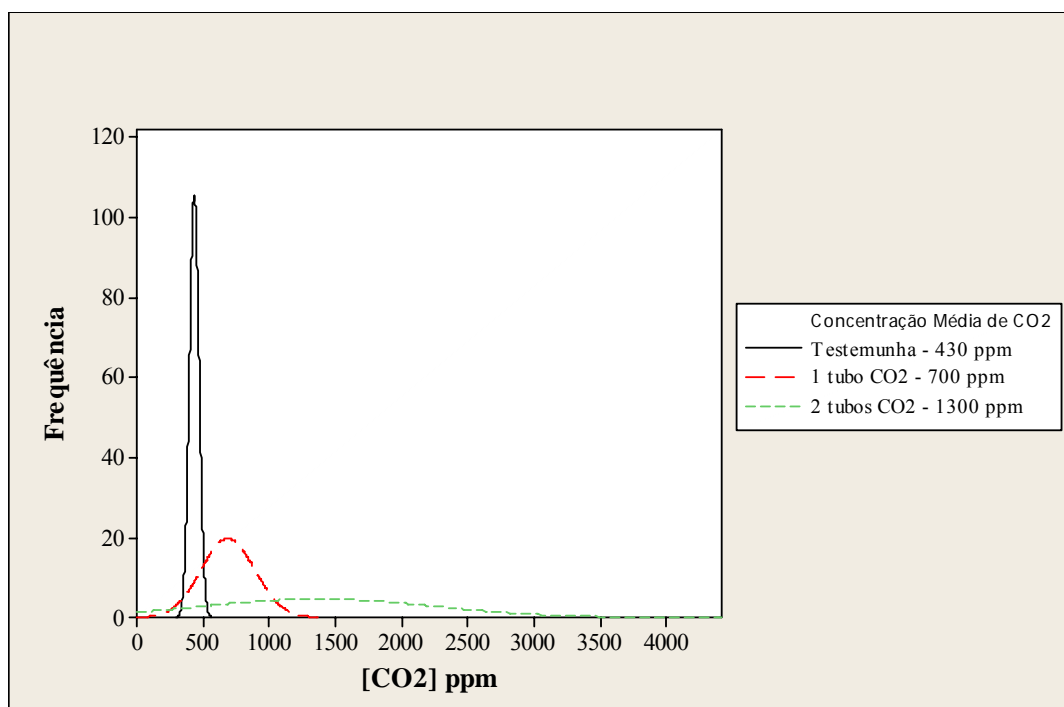
### **5.3 Análise dos dados**

Com os dados de esporulação do patógeno foi calculada a área abaixo da curva de progresso da esporulação (AACPE). Todos os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa MINITAB 14 (2003).

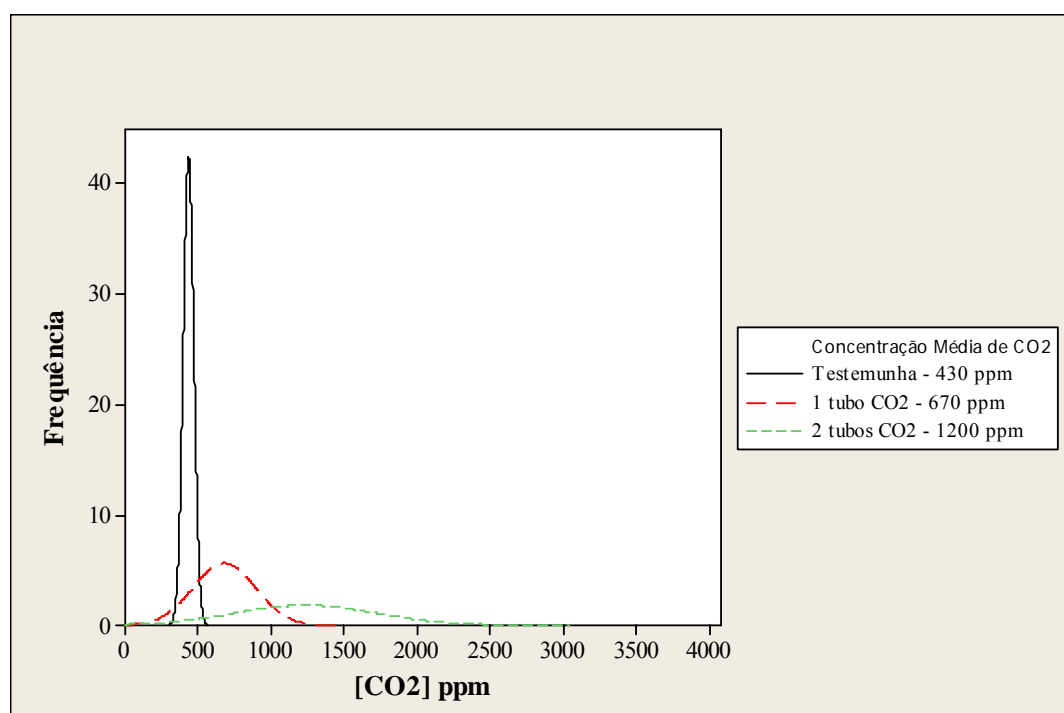
## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Efeito da concentração de CO<sub>2</sub> sobre agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro avaliado em discos foliares**

As Figuras 5 e 6 apresentam as concentrações de CO<sub>2</sub> utilizadas nos experimentos, que abrangem cenários futuros (otimista e pessimista) projetados pelo IPCC (2007). No cenário pessimista a concentração do CO<sub>2</sub> atmosférico poderá atingir 1000 ppm, ao passo que no cenário mais otimista 550 ppm. Essas alterações na concentração de CO<sub>2</sub> permitem estudar o comportamento das doenças de plantas em cenários futuros, a fim de que se adotem medidas de prevenção que minimizam os impactos nas doenças de plantas.



**Figura 5.** Concentração média de CO<sub>2</sub> nos tratamentos dos experimentos A e B.



**Figura 6.** Concentração média de CO<sub>2</sub> nos tratamentos do experimento C.

No experimento A, onde o antagonista utilizado foi o *Bacillus subtilis*, a esporulação de *H. vastatrix* foi maior na concentração de 1300 ppm de CO<sub>2</sub>, quando comparado com a testemunha absoluta de 380 ppm (Tabela 1). Nas concentrações de 430 ppm e 700 ppm de CO<sub>2</sub> não se obteve a diferença estatística da testemunha absoluta, porém há uma tendência de aumento da esporulação do patógeno, com o aumento da concentração do gás. Hibberd et al. (1996) descreveram que a possibilidade de esporulação intensa da espécie de oídio *Erysiphe graminis* em cevada ocorre pela maior disposição de carboidratos nas folhas. O aumento da taxa fotossintética propiciou maior resistência do hospedeiro à penetração do patógeno pela indução de resistência por mecanismos pós-formados.

Em relação à área foliar lesionada, verifica-se que apenas a concentração de 700 ppm diferiu da testemunha, sendo significativamente reduzida (Tabela 1). Estudos realizados com outros fitopatógenos indicam que com aumento de CO<sub>2</sub> na concentração de 700 ppm há uma redução na severidade da doença em relação à concentração de 350 ppm possivelmente pelo atraso no desenvolvimento inicial do patógeno e sua redução na penetração no hospedeiro (HIBBERD et al., 1996; CHAKRABORTY et al., 2000b; LESSIN, 2008).

O *B. subtilis* foi mais efetivo em reduzir tanto a área foliar lesionada quanto a AACPE quando aplicado nos discos simultaneamente ao patógeno (Tabela 1). A inoculação do antagonista realizada 24 horas antes à inoculação do patógeno também apresentou resultados promissores. Possivelmente, o *B. subtilis* inibiu a germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, quando aplicado antes da inoculação. Resultados semelhantes foram observados para esse antagonista por Bettiol et al. (1994), Shiomi et al. (2006) e Haddad et al. (2009). Não se obteve efeito com a aplicação do antagonista 24 horas após aplicação do patógeno como também observado por Shiomi et al. (2006) e Silva et al. (2008a). Não foi observado interação entre as concentrações de CO<sub>2</sub> e os períodos de inoculação na esporulação do patógeno.

Os períodos de aplicação do antagonista antes e simultâneo nas diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> foram mais efetivos na redução da severidade da doença (Tabela 1). Na concentração de 700 ppm, quando o antagonista foi aplicado simultaneamente ao patógeno, obteve-se a menor severidade da doença, favorecendo a ação do antagonista

sobre o patógeno, porém não difere estatisticamente com os mesmos tratamentos nas outras concentrações (Tabela 1).

**Tabela 1.** Área abaixo da curva do progresso da esporulação (AACPE) e porcentagem de área foliar lesionada por *Hemileia vastatrix* em diferentes concentrações de dióxido de carbono e períodos de inoculação do antagonista *Bacillus subtilis*.

Tratamento		AACPE (uredíniosporos/disco)	Área foliar lesionada (%)
CO <sub>2</sub>	380 ppm	1303646 b <sup>1</sup>	22,48 a
	430 ppm	1700625 ab	20,65 ab
	700 ppm	1784938 ab	16,77 b
	1300 ppm	1879521 a	21,90 ab
Período <sup>2</sup>	Antes	1052313 b	6,02 c
	Simultâneo	316542 c	3,40 c
	Depois	2585896 a	32,82 b
	Testemunha <i>H. vastatrix</i>	2713979 a	39,55 a
380 ppm (antes)		806667	5,00 c
380 ppm (simultâneo)		228500	2,70 c
380 ppm (depois)		2304583	37,40 a
380 ppm (testemunha)		1874833	44,80 a
430 ppm (antes)		1103250	5,00 c
430 ppm (simultâneo)		421000	3,20 c
430 ppm (depois)		2456000	31,30 a
430 ppm (testemunha)		2822250	43,10 a
700 ppm (antes)		880000	8,30 c
700 ppm (simultâneo)		130167	1,40 c
700 ppm (depois)		3164667	29,90 ab
700 ppm (testemunha)		2964917	27,50 ab
1300 ppm (antes)		1419333	5,80 c
1300 ppm (simultâneo)		486500	6,30 c
1300 ppm (depois)		2418333	32,70 a
1300 ppm (testemunha)		3193917	42,80 a

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem na mesma coluna (Tukey 5%)

<sup>2</sup> Antes – aplicação do antagonista 24 horas antes à inoculação da suspensão do patógeno; Simultâneo – aplicação simultânea das suspensões do antagonista e patógeno; Depois – aplicação da suspensão do antagonista 24 horas após a inoculação da suspensão do patógeno; Testemunha de *H. vastatrix* – somente inoculação da suspensão do patógeno.

A concentração do número de unidades formadoras de colônias de *Bacillus* não diferiu estatisticamente entre as concentrações de CO<sub>2</sub> (Tabela 2). Os resultados obtidos são importantes em cenários climáticos futuros, pois com aumento da concentração de CO<sub>2</sub> a população do antagonista não foi alterada. Esse gênero apresenta uma faixa de desenvolvimento ampla, capaz de suportar altas temperaturas, o que permite sua utilização em um ambiente mais hostil (BETTIOL, 2008).

**Tabela 2.** Efeito da concentração de CO<sub>2</sub> na unidade formadora de colônias de *Bacillus* nos discos foliares de cafeeiro, 62 dias após a inoculação.

Tratamento		<i>Bacillus</i> spp. (ufc/mL)
CO <sub>2</sub>	380 ppm	66500 a <sup>1</sup>
	430 ppm	59450 a
	700 ppm	58000 a
	1300 ppm	51350 a
Período <sup>2</sup>	Antes	85500 ab
	Simultâneo	60250 bc
	Depois	46625 c
	Testemunha <i>H. vastatrix</i>	2750 d
	Testemunha <i>B. subtilis</i>	99000 a

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem na mesma coluna (Tukey 5%)

<sup>2</sup> Antes – aplicação do antagonista 24 horas antes à inoculação da suspensão do patógeno; Simultâneo – aplicação simultânea das suspensões do antagonista e patógeno; Depois – aplicação da suspensão do antagonista 24 horas após a inoculação da suspensão do patógeno; Testemunha de *H. vastatrix* – somente inoculação da suspensão do patógeno; Testemunha de *B. subtilis* – somente aplicação do antagonista.

*B. pumilus* independente da concentração de CO<sub>2</sub> e do momento de sua aplicação nos discos de cafeeiro, não influenciou a AACPE e a porcentagem de área foliar lesionada pela ferrugem (Tabela 3). Apesar disso, outros autores relatam a eficiência desse antagonista no controle de doenças. Silva et al. (2008b) avaliaram o efeito de *B. pumilus* sobre a pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomateiro, e os isolados endofíticos dessa espécie apresentaram os melhores resultados na redução da severidade da doença, provavelmente pelo mecanismo de antibiose. Também Benhamou et al. (1996), Enebak e Carey (2000) e Munimbazi e Bullerman (1998) relatam o potencial de *B. pumilus* em controlar fitopatógenos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, além de outras espécies de ferrugem, como *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. Na concentração de 700

ppm ocorreu uma tendência ao aumento na esporulação do patógeno e diminuição na severidade da doença em relação à testemunha absoluta (380 ppm), como observado no experimento com *B. subtilis* e nos trabalhos de Hibberd et al. (1996) e Chakraborty et al. (2000b) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Área abaixo da curva do progresso da esporulação (AACPE) e porcentagem de área foliar lesionada por *Hemileia vastatrix* em diferentes concentrações de dióxido de carbono e períodos de inoculação do antagonista *Bacillus pumilus*.

Tratamento		AACPE (urediniosporos/disco)	Área foliar lesionada (%)
<b>CO<sub>2</sub></b>	380 ppm	306125 ab <sup>1</sup>	47,35 a
	430 ppm	304646 ab	50,14 a
	700 ppm	382688 a	46,92 a
	1300 ppm	295208 b	46,82 a
<b>Período<sup>2</sup></b>	Antes	311083 a	42,83 b
	Simultâneo	283125 a	48,88 ab
	Depois	329542 a	48,71 ab
	Testemunha <i>H. vastatrix</i>	364917 a	50,81 a
380 ppm (antes)		275500	39,84
380 ppm (simultâneo)		253500	51,72
380 ppm (depois)		286750	43,12
380 ppm (testemunha)		408750	54,72
430 ppm (antes)		292167	43,84
430 ppm (simultâneo)		292000	51,20
430 ppm (depois)		307167	51,56
430 ppm (testemunha)		327250	53,96
700 ppm (antes)		344500	41,08
700 ppm (simultâneo)		364833	49,24
700 ppm (depois)		418000	46,60
700 ppm (testemunha)		403417	50,76
1300 ppm (antes)		332167	46,56
1300 ppm (simultâneo)		222167	46,00
1300 ppm (depois)		306250	50,92
1300 ppm (testemunha)		320250	43,80

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem na mesma coluna (Tukey 5%)

<sup>2</sup> Antes – aplicação do antagonista 24 horas antes à inoculação da suspensão do patógeno; Simultâneo – aplicação simultânea das suspensões do antagonista e patógeno; Depois – aplicação da suspensão do antagonista 24 horas após a inoculação da suspensão do patógeno; Testemunha de *H. vastatrix* – somente inoculação da suspensão do patógeno.

No experimento *L. longisporum*, as AACPE e área foliar lesionada não foram influenciadas pelas concentrações de CO<sub>2</sub> (Tabela 4). Entretanto, quando o antagonista foi inoculado nos discos foliares, verifica-se uma redução significativa tanto na AACPE, como na porcentagem de área foliar lesionada, sendo mais efetivo quando aplicado antes ou simultaneamente ao patógeno (Tabela 4). *Lecanicillium* é relatado em campo parasitando *H. vastatrix* por diversos autores (BETTIOL, 1991; ESKES et al., 1991; ZAMBOLIM et al., 2005). Esse antagonista também é recomendado para controle de oídio em pepino por Kim et al. (2008) e Goettel et al. (2008), que testaram o produto Vertalec<sup>®</sup> à base de *Lecanicillium*.

Os resultados indicam que possivelmente o parasitismo da ferrugem do cafeeiro por *L. longisporum* não será modificado em relação às alterações das concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico. Porém, Eskes et al. (1991) relataram a dependência dos isolados do gênero *Verticillium* à alta umidade relativa do ar para controlar o patógeno. Uma diferença de 5% foi suficiente para afetar significativamente o desenvolvimento do antagonista. Assim, em regiões em que com as mudanças climáticas globais ocorre predominância de baixa umidade relativa, o efeito do *L. longisporum* sobre a ferrugem do cafeeiro será reduzido. Pozza e Alves (2008) observaram que nos cenários futuros, a região Sul, no Estado do Paraná e também na região Nordeste, onde o cultivo de café é dependente de maior manejo devido às altas temperaturas apresentarão baixa precipitação, o que resulta em mau desempenho ao agente de biocontrole pelo déficit hídrico.



**Tabela 4.** Área abaixo da curva do progresso da esporulação (AACPE) e porcentagem de área foliar lesionada por *Hemileia vastatrix* em diferentes concentrações de dióxido de carbono e períodos de inoculação do antagonista *Lecanicillium longisporum*.

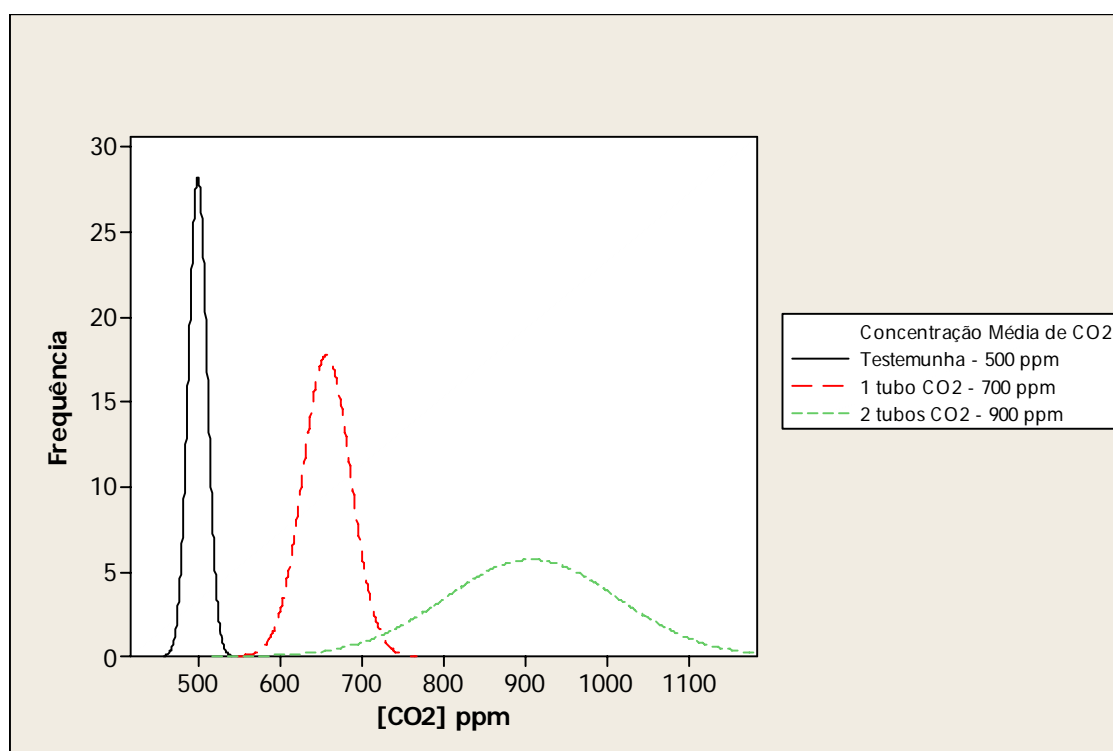
Tratamento		AACPE (urediniosporos/disco)	Área foliar lesionada (%)
CO <sub>2</sub>	380 ppm	169823 a <sup>1</sup>	37,32 a
	430 ppm	164938 a	37,65 a
	670 ppm	184187 a	40,58 a
	1200 ppm	184552 a	42,78 a
Período <sup>2</sup>	Antes	41052 b	28,00 c
	Simultâneo	97854 b	31,72 c
	Depois	61833 b	44,62 b
	Testemunha <i>H. vastatrix</i>	502760 a	53,99 a
380 ppm (antes)		34708	21,48
380 ppm (simultâneo)		66500	34,40
380 ppm (depois)		90708	42,76
380 ppm (testemunha)		487375	50,64
430 ppm (antes)		37042	26,96
430 ppm (simultâneo)		50750	28,52
430 ppm (depois)		95667	44,40
430 ppm (testemunha)		476292	50,72
670 ppm (antes)		40542	27,36
670 ppm (simultâneo)		55708	33,24
670 ppm (depois)		96250	43,60
670 ppm (testemunha)		544250	58,12
1200 ppm (antes)		51917	36,20
1200 ppm (simultâneo)		74375	30,72
1200 ppm (depois)		108792	47,72
1200 ppm (testemunha)		503125	56,48

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem na mesma coluna (Tukey 5%)

<sup>2</sup> Antes – aplicação do antagonista 24 horas antes à inoculação da suspensão do patógeno; Simultâneo – aplicação simultânea das suspensões do antagonista e patógeno; Depois – aplicação da suspensão do antagonista 24 horas após a inoculação da suspensão do patógeno; Testemunha de *H. vastatrix* – somente inoculação da suspensão do patógeno.

## 6.2 Efeito da concentração de CO<sub>2</sub> sobre *Hemileia vastatrix* em plântulas de cafeeiro

Na Figura 7 observam-se as concentrações de CO<sub>2</sub> em que o ensaio com plântulas de cafeeiro foi conduzido. A maior concentração de CO<sub>2</sub> na testemunha é devido à maior respiração de plântulas.



**Figura 7.** Concentração média de CO<sub>2</sub> no experimento com plântulas de cafeeiro para avaliar seu efeito sobre a ferrugem.

A concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico influenciou diretamente o período latente no terceiro par de folhas, o qual foi desenvolvido nas concentrações estudadas (Tabela 5). Nesse par de folhas observa-se que na concentração de 400 ppm de CO<sub>2</sub>, o PLM foi de 36,43 dias, diferindo estatisticamente das concentrações de 500, 700 e 900 ppm, que foram de 21,23; 21,28 e 18,67 dias. Por outro lado, não foi observado efeito no segundo par de folhas o qual foi desenvolvido nas condições de concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico atual (Tabela 5). Esses resultados estão de acordo com Zambolim et al. (2005) os quais relatam o período

latente de 38 a 70 dias para a ferrugem do cafeeiro nas condições atmosféricas atuais de 380 ppm de CO<sub>2</sub>. Os resultados do período latente para a ferrugem do cafeeiro diferem dos estudados por Chakraborty et al. (2000b) para *Colletotrichum gloeosporioides* em *Stylosanthes scabra*, o qual manteve-se inalterado entre as concentrações de 350 e 700 ppm de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 5.** Período latente médio (PLM) no segundo e terceiro pares de folhas em diferentes concentrações de dióxido de carbono.

Concentração de CO <sub>2</sub> (ppm)	PLM (dias) 2ª folha	PLM (dias) 3ª folha
400	21,22 a <sup>1</sup>	36,43 a
500	18,79 a	21,23 b
700	19,94 a	21,38 b
900	20,42 a	18,67 b

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem na mesma coluna (Tukey 5%). O segundo par de folhas foi desenvolvido nas condições de concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico atual, enquanto o terceiro par de folhas se desenvolveu completamente nas condições das diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>.

A concentração de CO<sub>2</sub> não influenciou estatisticamente na esporulação do patógeno, na área foliar, na área foliar lesionada e no diâmetro e altura das plântulas de cafeeiro (Tabelas 6 e 7). Em relação à esporulação do patógeno, houve uma tendência ao aumento da esporulação, com o aumento da concentração do CO<sub>2</sub>.

Driscoll et al. (2005) estudaram os efeitos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> em plantas de milho nas concentrações de 350 e 700 ppm. As plantas que se desenvolveram na concentração de 700 ppm apresentaram o mesmo número de perfilhos, porém o crescimento das plantas e o índice estomatal foram maiores em altas concentrações de CO<sub>2</sub>. A ausência de diferença estatística significativa nas diferentes avaliações pode ser atribuída ao tempo de exposição das plântulas às concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico, pois as plântulas já possuíam o segundo par de folhas formado quando foram introduzidas na sala climatizada.

A redução no período latente observado no ensaio é uma informação de extrema importância para as considerações epidemiológicas da ferrugem do cafeeiro, pois se refere ao comportamento do patógeno em interação do hospedeiro e o ambiente. Quanto

menor o período de latência, o hospedeiro é mais suscetível, o patógeno mais agressivo e o ambiente favorável. Os períodos latentes prolongados indicam hospedeiros resistentes e/ou patógenos menos agressivos e/ou ambiente desfavorável (AMORIM, 1995).

**Tabela 6.** Esporulação de *Hemileia vastatrix*, área foliar (cm<sup>2</sup>), área foliar lesionada (%) do segundo e terceiro pares de folhas das plântulas de café em diferentes concentrações de dióxido de carbono.

Concentração de CO <sub>2</sub> (ppm)	Esporulação (urediniosporos/folha)		Área foliar (cm <sup>2</sup> )		Área lesionada (%)	
	2 <sup>a</sup> folha	3 <sup>a</sup> folha	2 <sup>a</sup> folha	3 <sup>a</sup> folha	2 <sup>a</sup> folha	3 <sup>a</sup> folha
400	7100 a <sup>1</sup>	2500 a	5,89 a	6,58 a	27,16 b	12,84 a
500	7300 a	3700 a	6,28 a	7,39 a	38,72 a	23,16 a
700	15000 a	7650 a	6,17 a	7,83 a	29,64 ab	15,96 a
900	13750 a	10500 a	6,15 a	7,89 a	35,64 ab	12,64 a

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem na mesma coluna (Tukey 5%)

**Tabela 7.** Diâmetro do caule (mm) e altura (cm) das plântulas de café em diferentes concentrações de dióxido de carbono.

Concentração de CO <sub>2</sub> (ppm)	Diâmetro do caule (mm)	Altura das plântulas (cm)
400	2,05 a <sup>1</sup>	9,37 a
500	2,03 a	9,41 a
700	2,06 a	9,85 a
900	2,04 a	9,26 a

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem na mesma coluna (Tukey 5%)

## 7 CONCLUSÕES

- Os antagonistas *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Lecanicillium longisporum* não são afetados pelo aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico, *in vitro*, a 22 °C e 100% da umidade relativa;
- *B. subtilis* é efetivo no controle da ferrugem independentemente da concentração de CO<sub>2</sub>, sendo mais efetivo quando aplicado antes e simultaneamente ao patógeno;
- *B. pumilus*, independente do aumento do CO<sub>2</sub> e do momento de aplicação, não influencia a AACPE e a porcentagem de área foliar lesionada;
- *L. longisporum* reduz a AACPE e a porcentagem de área foliar lesionada, independente da concentração de CO<sub>2</sub>;
- O período latente médio da ferrugem do cafeeiro é de 36,4; 21,2; 21,3 e 18,6 dias para as concentrações de 400, 500, 700 e 900 ppm de CO<sub>2</sub> atmosférico em mudas desenvolvidas a 22 °C e 100% de umidade relativa.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. London: Elsevier, 2004. 922 p.

AMORIM, L. Colonização e Reprodução. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 309-324.

ASSAD, E.D.; PINTO, H.S.; JUNIOR, J.Z.; ÁVILA, A.M.H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, 2004.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; QUADT-HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, v. 112, n. 3, p. 919-929, 1996.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle de Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). **Summa Phytopathologica**, v. 15, n. 3/4, p. 257-266, 1989.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (ed) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1991. p.1-5.

BETTIOL, W.; SAITO, M.L.; BRANDÃO, M.S.B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2, p. 119-122, 1994.

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: SANHUEZA, R.M.V.; MELO, I.S. (Org.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1995. p. 35-36.

BETTIOL, W. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: GHINI, R. HAMADA, E. (ed) **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa/SCT, 2008, p. 299-321.

BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, v. 20, p. 167-192, 1982.

BOLDINI, J.M. **Epidemiologia da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro irrigado e fertirrigado**. 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitopatologia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

CARVALHO, V.L.; CUNHA, R.L., CHALFOUN, S.M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 101-114, 2002.

CHAKRABORTY, S.; TIEDEMANN A.V.; TENG, P.S. Climate change: potential impact on plant diseases. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 317-326, 2000a.

CHAKRABORTY, S.; PANGGA, I.B.; LUPTON, J.; HART, L.; ROOM, P.M.; YATES, D. Production and dispersal of *Colletotrichum gloeosporioides* spores on *Stylosanthes scabra* under elevated CO<sub>2</sub>. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 381-387, 2000b.

CHAKRABORTY, S.; LUCK, J.; HOLLAWAY, G.; FREEMAN, A.; NORTON, R.; GARRETT, K.A.; PERCY, K.; HOPKINS, A.; DAVIS, C.; KARNOSKY, D.F. Impacts of Global Change on Diseases of Agricultural Crops and Forest Trees. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, n. 54, p. 1-15, 2008.

CHACUR, E.; SOBRINHO, F.P.; FREITAS, J.M.; GUEDES, M.A.; ABREU, P.F.; JOTA, W.S. Informe estatístico do café, dezembro de 2007. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 04 mai. 2009.

COAKLEY, S.M.; SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S. Climate change and plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 399–426, 1999.

COSTA, M.J.N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. Viçosa, v. 32, n. 2, p. 150-155, 2007.

DRISCOLL, S.P.; PRINS, A.; OLMOS, E.; KUNERT, K.J.; FOYER, C.H. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO<sub>2</sub> enrichment in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 381-390, 2006.

ENEBAK, S.A.; CAREY, W.A. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Disease**. v. 84, n. 3, p.306-308. 2000.

ESKES, A.B. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 88, p. 127-141, 1982.

ESKES, A.B.; MENDES, M.D.L.; ROBBS, C.F. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. **Café Cacao Thé**, v. 35, n. 4, 1991.

GARÇON, C.L.P.; ZAMBOLIM, L.; MIZUBUTI, E.S.G.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, n. 5, p. 486-491, 2004.

GARRET, K.A.; DENDY, S.P.; FRANK E.E.; ROUSE, M.N.; TRAVERS, S.E. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.489-509, 2006.



GHINI, R. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 104 p.

GHINI, R. HAMADA, E. Proposta metodológica para discussão dos impactos das mudanças climáticas globais sobre doenças de plantas. In: GHINI, R. HAMADA, E. (ed) **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa/SCT, 2008, p. 15-24a.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Climate change and plant diseases. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 98-107, 2008b.

GHINI, R.; HAMADA, E.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; MARENGO, J.A.; GONÇALVES, R.R.V. Risk analysis of climate change on coffee nematodes and leaf miner in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 43, n. 2, p. 187-194, 2008c.

GRÜTER, D.; SCHMID, B; BRANDL, H. Influence of plant diversity and elevated atmospheric carbon dioxide levels on belowground bacterial diversity. **BMC Microbiology**, v. 6; p. 68-75, 2006.

GOETTEL, M.S.; KOIKE, M.; KIM, J.J.; AIUCHI, D.; SHINYA, R.; BRODEUR, J. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.98, p. 256–261, 2008.

GOLDSON, S.L. Climate change and biological control. In: Newton, P.C.D. et al. **Agroecosystems in a changing climate**. New York: CRC Press, 2006. p. 329-332.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 449-454, 1996.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236f. Tese (Doutorado em Ciências/ Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

HADDAD, F.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; TEIXEIRA, H. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. **Biological Control**, v. 49, p. 114–119, 2009.

HAMADA, E.; GONÇALVES, R.R.V.; ORSINI, J.A.M.; GHINI, R. Cenários climáticos futuros para o Brasil. In: GHINI, R. HAMADA, E. (ed) **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa/SCT, 2008, p. 25-73.

HIBBERD, J.M.; WHITBREAD, R.; FARRAR, J.F. Effect of elevated concentrations of CO<sub>2</sub> on infection of barley by *Erysiphe graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48, p. 37-53, 1996.

IPCC. **Climate change 2007**: Synthesis Report. Valencia: IPCC, 2007. 73 p.

JEGER, M.J.; PAUTASSO, M. Plant disease and global change – the importance of long-term data sets. **New Phytologist**. v. 177, p. 8-11, 2008.

KIM, J.J.; GOETTEL, M.S.; GILLESPIE, D.R. Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec<sup>®</sup> for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. **Biological Control**, v. 45, p. 404–409, 2008.

LESSIN, R.C. **Efeito do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico sobre o oídio, a ferrugem e o desenvolvimento de plantas de soja**. 2008. 67f. Dissertação (Mestre em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

LIN, B.B. Agroforestry management as an adaptive strategy against potential microclimate extremes in coffee agriculture. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 144, p. 85–94, 2007.

MANNING, W.J.; TIEDEMANN, A.V. Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), ozone (O<sub>3</sub>), and ultraviolet-b (UV-B) radiation on plant diseases. **Environmental Pollution**, v. 88, p. 219-245, 1995.

MARENGO, J. A. **Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade:** caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília: MMA, 2006. 212 p.

MARENGO, J.A.; NOBRE, C.A.; SALATI, E.; AMBRIZZI, T. Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. **Sumário Técnico**, Ministério do Meio Ambiente - MMA, Secretaria de Biodiversidade e Florestas –SBF, Diretoria de Conservação da Biodiversidade – DCBIO: Brasília, 2007, 50 p.

MARTINS, E.M.F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (ed) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1991. p.345-363.

MINITAB® Statistical Software. Version 14. USA: Minitab Inc., 2003. 1 CD-ROM.

MIRANDA, J.I.; NETO, J.C. LIVIA – um software para classificação não supervisionada de áreas foliares infectadas pela ferrugem do café. **Comunicado Técnico 87**. Campinas: Embrapa-CNPTIA, 2008. 5 p.

MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L.B. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 959–968, 1998.

OLIVEIRA, F.A. **Validação de modelos de previsão da ferrugem do cafeeiro e monitoramento de esporos de *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola* em Lavras, MG**. 2005. 98f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitopatologia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

POZZA, E.A.; ALVES, M.C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. In: GHINI, R. HAMADA, E. (ed) **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa/SCT, 2008, p. 215-233.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: ed. UFV, 2007. 269 p.

SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; MELO, I.S.; NUNES, F.V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 32-39, 2006.

SILVA, H.S.A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C.R.F.; TOZZI, J.P.L.; MELO, I.S.; NUNES, F.V. Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 38, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2006a. 28 p.

SILVA, M.C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; AZINHEIRA, H.G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A-S; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Pathology**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 1, p.119-147, 2006b.

SILVA, H.S.A.; TERRASAN, C.R.F.; TOZZI, J.P.L.; MELO, I.S.; BETTIOL, W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 49-54, 2008a.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTROS, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008b.

VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; JESUS JUNIOR, W.C. Efeito da temperatura no período latente de *Hemileia vastatrix* Berk & Br., agente causal da ferrugem do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas, **Resumos expandidos**. Brasília, D.F.: Embrapa Café, Belo Horizonte, Minasplan, 2000, p. 175-178.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, E.M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 165-180.